



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

VIABILIDAD DEL SEMEN DILUIDO PROVENIENTE DE
CERDOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL
RUBULAVIRUS PORCINO.

T E S I S

PRESENTADA ANTE LA DIVISION DE ESTUDIOS
PROFESIONALES DE LA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
POR:
MARIO SOLIS HERNANDEZ

ASESORES:

- HUMBERTO RAMIREZ MENDOZA, MVZ., MPA., DC.
- JESUS HERNANDEZ LOPEZ, MVZ., M en C, DC.
- MA. DEL CARMEN MERCADO GARCIA, MVZ.
- SUSANA ESPINOSA HERNANDEZ, MVZ., EPA., M en C.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

CONTENIDO

	<u>Página</u>
AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	10
OBJETIVOS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	36
PERSPECTIVAS	37
LITERATURA CITADA	38
CUADROS	44
GRÁFICAS	72
FOTOGRAFÍAS	76

Este trabajo se lo dedico con mucho cariño . . .

A mis padres . . .

. . . por haberme dado la vida, amor, tiempo, cariño . . .

El día de hoy se cumple un sueño anhelado.

¡Espero no haberlos defraudado!.

A Eduardo . . .

Me asombra la valentía y el coraje con los que afrontas y resuelves tus problemas. ¡Muy pronto comenzarás a cosechar los frutos que anteriormente sembraste en el camino!.

A Maribel y Yazmín . . .

Recuerdo aquel momento cuando me regalaron un separador de libros con una frase escrita por Gohetz, que decía "Si no sabes a donde vas, voltea a ver de donde vienes". Ahora quiero que conozcan la frase que escribí para ustedes. "Si no sabes a donde ir, es porque no has pensado hasta donde puedes llegar".

A Sandra ! . . .

Este es un momento en el quiero expresar mil cosas pero las ideas no aterrizan. ¡Gracias! por compartir todos los momentos que juntos hemos vivido, pero más aún, por brindarme tú apoyo en aquellos momentos de frustración.

A mis asesores . . .

Humberto Ramírez Mendoza.

Jesús Hernández López.

Susana Espinosa Hernández.

María del Carmen Mercado García.

**. . . por haberme brindado la oportunidad de compartir nuevas
experiencias en el campo de la ciencia.**

A los miembros del jurado . . .

Dra. Patricia Noe Martínez

Dr. Marco Antonio Herradora Lozano

Dra. Ma. Elena Trujillo Ortega

Dr. Juan Antonio Montaña Hirose.

Dr. Humberto Ramírez Mendoza

. . . por el tiempo invertido para que éste trabajo se realizara de la mejor manera posible.

Para terminar, quiero compartir con ustedes unas líneas que llevan por título "Buscar y encontrar oportunidades".

Muchos piensan que el hecho de buscar buenas oportunidades para un mejoramiento personal significa entrar en problemas. Falso resulta tal pensamiento y sólo expresan esto quienes se refugian en la indolencia y cobardía. El "no te busques problemas" es una expresión de apáticos y conformistas que piensan que las dificultades que pudieran surgir se resuelven por sí solas. No es posible olvidar que la vida es esfuerzo y preparación permanente.

La realización de grandes empresas se ha logrado por la decisión de aceptar responsabilidades y no escatimar esfuerzos. Quien busca problemas busca oportunidades y quien las encuentra demuestra capacidad y está a la vez, en posición correcta de encontrar éxitos.

Si en verdad se encuentran problemas, no pueden ser permanentes porque la voluntad, decisión, perseverancia y un criterio analítico permitirán resolverlos favorablemente.

Todas las personas amantes de progresos se revisten de sensatez y empiezan a "buscar problemas"; éstos serán los que impulsen a encontrar la satisfacción de haber luchado para un mejoramiento propio y quizá para todos aquellos que los rodean. Buscar oportunidades es tener un avance prudente en pos del éxito, es no claudicar ante las adversidades, es olvidar la palabra imposible. El que triunfa en el ambiente en que se desarrolla es el que tira obstáculos ante el reto que tuvo en la realización de grandes tareas.

- Muchas gracias -

RESUMEN.

SOLÍS HERNÁNDEZ, MARIO. Viabilidad del semen diluido proveniente de cerdos infectados experimentalmente con el *rubulavirus porcino*. (Bajo la dirección de: Humberto Ramírez Mendoza, Jesús Hernández López, Ma. del Carmen Mercado García y Susana Espinosa Hernández).

El objetivo de este trabajo fue determinar la viabilidad de los espermatozoides de cerdo diluidos en una solución de Beltsville Tawing Sopan (BTS) a las 24, 48 y 72 horas de haber sido colectadas las muestras de semen. El semen provenia de cinco cerdos inoculados intranasalmente con el *rubulavirus porcino*. Los animales fueron monitoreados durante 59 días después de la inoculación. Las muestras de semen fueron analizadas por citometría de flujo. Se utilizó ioduro de propidio para distinguir las células vivas de las muertas. Con la tinción de cristal violeta se determinó la morfología espermática. La concentración espermática fue determinada con una cámara de Neubauer. El eyaculado fue diluido en 50 ml de BTS a una concentración de 3×10^4 células y fue almacenado en frascos cónicos a 20°C durante 72 horas. Durante el período de monitoreo no se observaron cambios en el comportamiento, la libido y en el consumo de alimento de los animales. Se observó descenso en la motilidad y la concentración espermática en uno de cinco cerdos entre los días 25 y 42 post-infección respectivamente. El número de espermatozoides muertos se incrementó en las muestras de semen de los cinco sementales a partir de los días 2, 4, 7, 9 y 16 post-infección respectivamente. El *rubulavirus porcino* fue aislado en las muestras de semen a partir del día 2 post-infección. Anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación fueron identificados en los animales infectados entre los días 7 y 56 post-infección.

SUMMARY.

The aim of this study was to determine spermatozoan viability diluted in Beltsville Thawing Solution (BTS) at 24, 48 and 72 hours after semen samples were collected. Five boars intranasally inoculated with *porcine rubulavirus* were monitored for 59 days after exposure. Boar spermatozoan samples were analysed directly by flow cytometry, using propidium iodide to distinguish dead cells. The use of crystal-violet stain detected the sperm abnormalities. The sperm concentration was determined in a Neubauer cell chamber under a phase contrast microscope. The ejaculate was diluted in 80 ml of BTS to 3×10^9 cells. Such dilutions were stored in conical flasks at 20°C for 72 hr. During the monitoring period, changes in appetite, behavior or libido were not detected. Changes in semen volume was not detected after infection. Reduced spermatozoan motility and concentration were detected in semen samples collected from 1 of 5 boars through days 21 and 25 after infection. Changes in semen color was detected in semen samples collected from 1 of 5 boars between days 25 and 42 after infection. Increased spermatozoan death was detected in nearly all semen samples collected from the 5 infected boars through days 2, 4, 7, 9, and 16. The *porcine rubulavirus* was detected in nearly all semen samples collected from the 5 infected boars since day 2 after infection. High titers of hemagglutination inhibitory antibodies were identified in infected animals between days 7 and 56 after inoculation.

INTRODUCCIÓN.

La enfermedad del ojo azul (EOA) apareció por primera vez en La Piedad Michoacán, México, en el año de 1980 cuando se registraron numerosos brotes de encefalitis en lechones menores de 20 días de edad y una opacidad corneal característica que se tornaba azul turquesa[39].

En cerdos lactantes las manifestaciones clínicas son fiebre, pelo hirsuto, conjuntivitis, lomo arqueado, debilidad y depresión. Los signos nerviosos se presentan en forma progresiva observándose hiperexcitabilidad, incoordinación, rigidez, temores musculares, movimientos involuntarios, adopción de posiciones anormales, desplazamiento en círculos, postración y muerte[40].

Stephano et al. asociaron a la EOA con un virus hemoaglutinante y lo denominaron *paramixovirus del ojo azul* (POA) [39,40]. Posteriormente, Moreno-López et al. caracterizaron al virus y lo denominaron *paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán* (PMVP/LPM) [25]. Actualmente está clasificado dentro del orden Mononegavirales, familia Paramyxoviridae, subfamilia Paramyxovirinae, género Rubulavirus, especie *rubulavirus porcino* (RVP) [44].

El RVP es un virus RNA envuelto con propiedades hemoaglutinantes, hemolíticas y formadoras de sincitios. La replicación del virus produce efecto citopático en una amplia variedad de células y aglutina eritrocitos de mamíferos y aves. Al microscopio electrónico se observan viriones pleomórficos que miden de 180 a 300 nm y están formados por una nucleocápside helicoidal protegida por una envoltura lipoproteica de 8 a 12 nm[25]. El RVP está constituido por seis proteínas estructurales, hemoaglutinina-neuraminidasa (HN), fusión (F) y matriz (M) expresadas en la envoltura; la nucleoproteína (NP), la fosfoproteína (P) y la proteína de alto peso molecular (L) en la nucleocápside[42].

El RVP puede ser diseminado por personas, vehículos y posiblemente por aves y el viento. En animales afectados subclínicamente, el RVP es excretado por secreciones nasales. El contacto de los animales infectados clínica o subclínicamente con los animales susceptibles es el mecanismo de infección[37,38].

Experimentalmente se ha demostrado que cerdos de tres días de edad, inoculados con el RVP muestran severos signos neurológicos entre los días 8 y 11 post-infección (pi) y que existe una gran cantidad de virus en el sistema nervioso central (SNC)[2]. El virus se disemina dentro del SNC utilizando las vías de conducción del estímulo olfatorio (bulbo, tracto y corteza olfatoria del bulbo piriforme)[2,32,33,34,35], y el día 7 pi llega a las estructuras mesencefálicas: hipocampo, tálamo e hipotálamo[34]. En infecciones experimentales con el virus de la estomatitis vesicular (VEV), se ha observado que la migración viral al cerebro de ratones es similar a las infecciones que ocasiona el RVP[17]. Estudios recientes han demostrado que las moléculas de NeuAc α 2,3Gal (salil α 2,3lactosa) son importantes para determinar la susceptibilidad a la infección por el RVP[33,35] y se ha establecido una correlación directa con los sitios donde el virus se puede aislar[30,31]. La expresión de NeuAc α 2,3Gal en la superficie de las células es fundamental para que el RVP realice el proceso de infección ya que cuando éste no está no hay infección[33].

En cerdos adultos se han identificado cambios en la expresión de sialoglicoconjugados; estos cambios se asocian con la maduración del tejido nervioso y están relacionados con la susceptibilidad a la infección por el RVP. Las modificaciones presentadas en la mucosa olfatoria y el SNC durante la maduración son suficientes para evitar el reconocimiento y la adhesión, de manera que el virus no logra infectar

al SNC de los cerdos adultos[33]. Las manifestaciones clínicas se limitan al aparato reproductor, en donde se observan abortos, mortinatos y regreso al estro en las hembras gestantes[37,38]; y epididimitis, orquitis, atrofia testicular y una sensible pérdida de fertilidad en los machos[30,31,37,38].

En algunos casos, la inoculación de cerdos machos adultos con el RVP provoca un estado febril a las 24 horas, seguido por depresión y anorexia[31]. La inflamación del epidídimo ocurre a los 15 días pi y se puede apreciar un aumento en el tamaño de los testículos y una consistencia rígida a la palpación en la cola del epidídimo[30,31,45].

La disminución en la concentración y la motilidad de los espermatozoides en muestras de semen de verracos inoculados experimentalmente con el RVP se presenta a partir de los 21 días pi. Las alteraciones en los parámetros reproductivos de los cerdos se pueden asociar a la presencia de nódulos en la cabeza del epidídimo a partir del día 15 pi y a la atrofia testicular que se presenta a partir del día 30 pi[30]. El RVP se ha aislado a partir de testículo, epidídimo, próstata, vesícula seminal y glándulas bulbouretrales[30,31,37,38].

Para el diagnóstico serológico de la EOA se han utilizado las técnicas de inhibición de la hemoaglutinación (IH)[12,29], seroneutralización (SN) y ELISA; sin embargo, se ha observado que el método de SN es el más sensible, seguido por el ELISA competitivo y la IH[12].

Muestreos serológicos han determinado que en los estados de Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Estado de México, Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro, Tabasco, Yucatán, Tamaulipas y Puebla, además del Distrito Federal existe la presencia de anticuerpos contra el RVP. Los estados del altiplano de México continúan siendo la principal zona de infección y diseminación de la EOA hacia estados libres de la enfermedad[6]. Para

el control de la EOA se han elaborado distintas vacunas[9,11,12] sin que a la fecha exista alguna de eficacia comprobada.

La inseminación artificial (I.A.) se practicó, por primera vez en los cerdos, en la década de 1930[16]. La I.A. en su sentido amplio se define como la transferencia de los gametos del macho para llegar al oocito por medios distintos al apareamiento natural[15]. La I.A. constituye una técnica que ha permitido un avance acelerado en los programas reproductivos y genéticos de la especie porcina[7]. Un componente importante de la I.A. comprende el examen del macho en cuanto a su desarrollo estructural normal y el análisis del eyaculado[15]. La determinación de la calidad seminal es un elemento fundamental de la valoración de un reproductor para controlar problemas de infertilidad o detectar que puede ser de mayor productividad. La contrastación del semen se realiza mediante la determinación del porcentaje de motilidad, concentración espermática, fijación del acrosoma, evaluación bioquímica del semen y la utilización de diferentes técnicas de tinción para distinguir las diferentes estructuras en las distintas partes del espermatozoide y para poner en evidencia estructuras morfológicas intracelulares[24].

El olor del esperma permite sacar ciertas conclusiones sobre la ulterior capacidad de empleo del eyaculado. La existencia de olores fuertes o específicos del verraco indican que el eyaculado se contaminó con orina y secreción prepucial. Un eyaculado de este tipo contiene por lo regular una elevada proporción de gérmenes. Ello hace que sea muy corto su plazo de empleo, no debiendo incluso utilizarse. El olor pútrido indica alteraciones patológicas; en este caso suele modificarse también el color del eyaculado[19].

El color del eyaculado debe ser blanco. Las desviaciones hacia tonalidades amarillas, verdes o rosas son indicio de contaminación de origen patológico (pus, bacterias, orina) [10,15,19,23].

El volumen del eyaculado se determina inmediatamente después de la colección del semen en recipientes graduados de dilución. El volumen se cuantifica en centímetros cúbicos (cc) o mililitros (ml); para esta evaluación se utilizan recipientes graduados o se pesa el eyaculado, considerando que 1 cc = 1 ml. En el verraco es por término medio de 200 ml y fluctúa entre 50 y 500 ml de acuerdo con la edad del animal, la técnica de obtención del espermatozoide y las características individuales [10,15,19,23].

La proporción existente de espermatozoides con movimiento se determina microscópicamente. Estas cifras están siempre sometidas a influencias subjetivas [19]. La motilidad se determina por observación al microscopio óptico y se evalúa el porcentaje de células en movimiento (0 - 100) o se valora el tipo de movimiento con una puntuación de 0 a 5. También se utilizan métodos basados en sistemas electrónicos de imagen con técnicas fotoeléctricas. Estos sistemas están conectados a un ordenador que proporciona información sobre velocidad, tipo de movimiento y rastro de la trayectoria del espermatozoide en pantalla [24].

El conocimiento de la concentración de espermatozoides es dato necesario para fijar el grado de dilución y con él el aprovechamiento del eyaculado [10,15,19,23,24]. Color y consistencia guardan entre ellos relación y son expresión de la concentración de espermatozoides, es decir, del número de éstos por unidad de volumen [19].

Una de las técnicas más utilizadas actualmente para la observación del acrosoma es la fijación por formaldehído o glutaraldehído de la célula espermática. El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación

por contener las enzimas necesarias para la penetración del cumulus oophorus y de la zona pelúcida[24].

La proporción de espermatozoides anormalmente conformados sirve como criterio dictaminador de la aptitud del verraco para la reproducción[19]. Las anomalías morfológicas primarias están causadas por afecciones directamente en la espermatogénesis y en las alteraciones patológicas de los testículos, en especial de los tubos seminíferos. Las anomalías secundarias se deben a alteraciones en etapas posteriores del desarrollo. Con frecuencia las anomalías secundarias obedecen a eyaculaciones defectuosas o incompletas, desequilibrios térmicos, enfermedades genitales o manipulación deficiente del semen una vez recogido[14]. Para determinar la proporción de espermatozoides de conformación normal y de espermatozoides con alteración patológica, se debe realizar algún tipo de tinción[19].

En las tinciones totales se pueden distinguir entre aquellas que proporcionan una coloración uniforme del espermatozoide denominadas coloraciones simples (azul de metileno, azul de toluidina, violeta de genciana, fucsina), mientras que otras hacen aparecer las diferencias estructurales en las distintas partes del espermatozoide, como modificaciones de la cabeza, en el acrosoma o en la pieza intermedia, denominadas coloraciones dobles (William, Giemsa, Karras)[24].

Las tinciones vitales se utilizan para poner en evidencia estructuras morfológicas intracelulares, y a la vez para estudiar la permeabilidad de algunas interfases en la evolución de la célula. Entre las técnicas de tinción más utilizadas destacan eosina-nigrosina, tripán azul y tinción de Giemsa[24]. Recientemente, se ha utilizado la tinción de yoduro de propidio (ip) para determinar la viabilidad espermática, diferenciando a las células vivas de las muertas[3,20]. Por último destaca la utilización de la triple tinción, que permite valorar la

vitalidad del espermatozoide y el estado de la estructura acrosómica[24].

La viabilidad del semen sin diluir está entre 2 y 24 horas después de la eyaculación, pero mediante la adición de diluyentes estas cifras se pueden elevar considerablemente[16]. El diluir el semen en un diluyente amortiguado que contenga antibióticos ayuda a mantener la viabilidad del esperma durante un corto lapso antes del uso o congelación. Los diluyentes difieren en su composición según la especie, el uso, la temperatura a la cual se almacenará el semen diluido y la duración del almacenamiento deseado. Todos los diluyentes se basan en un amortiguador particular, que otorga los mejores resultados para una especie dada. Los amortiguadores modulan el cambio en el pH del diluyente debido a los productos metabólicos del esperma almacenado. Además se agregan carbohidratos para suministrar una fuente de energía para la glucólisis del esperma. Se utilizan antibióticos para controlar el crecimiento de bacterias que pudieran haberse recogido durante el proceso de recolección. Algunos diluyentes mantienen la viabilidad del esperma a temperatura ambiente, mientras que otros se refrigeran entre 4 y 5°C para ayudar a controlar el crecimiento bacteriano y reducir la tasa metabólica de los espermatozoides[15].

HIPÓTESIS.

La presencia del RVP en el semen de verracos provoca una disminución en la calidad del semen.

OBJETIVOS

1. Determinar la viabilidad del semen evaluando el porcentaje de motilidad, espermatozoides vivos y muertos, concentración de espermatozoides y porcentaje de anomalías antes y después de la inoculación experimental con el RVP.
2. Determinar las características macroscópicas y microscópicas del semen de verracos antes y después de la inoculación experimental con el RVP.
3. Aislar el RVP eliminado en semen.
4. Titular el RVP aislado.
5. Determinar la motilidad de los espermatozoides diluidos en la solución de Beltsville Thawing (BTS) a las 24, 48 y 72 horas de colectado el semen, antes y después de la inoculación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Virus

Se utilizó el RVP de la cepa *Producción Animal Cerdos III (PAC-III)* [30], el cual fue proporcionado por el Departamento de Producción Animal: Cerdos (DPAC) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El título del lote viral fue de 32 unidades hemoaglutinantes (UHA)/0.05 ml y de 10^7 TCID₅₀/ml.

Animales

Este trabajo se realizó con cinco sementales híbridos, mayores de 9 meses de edad, procedentes del Centro Experimental, de Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), Jilotepec, México; clínicamente sanos, serológicamente negativos a la EOA y sin presencia de partículas virales en el semen. Cada cerdo se alojó individualmente en un corral, proporcionándoles un ambiente confortable. Los animales fueron identificados como semental uno, semental dos, semental tres, semental cuatro y semental cinco.

Entrenamiento de los animales

El entrenamiento de los verracos consistió en hacer saltar a cada verraco sobre un potro o maniquí para poder realizar la colección de semen [14]. El entrenamiento de cada cerdo se realizó directamente con un potro fijo en el área de recolección de semen. Cuando se consiguió que los cerdos saltaran sobre el potro, se comenzó a evaluar la calidad seminal de cada animal.

Colección del semen

La recolección del semen de cada verraco se hizo por la técnica de la mano enguantada [4, 16, 18, 19, 24]. El eyaculado se colectó directamente en vasos de precipitado limpios y estériles, los cuales se depositaron dentro de un termo atemperado para mantener la temperatura cercana a los

37°C. Sobre los vasos se colocó una gasa estéril para que durante la recolección se impidiera la mezcla de la fracción espermática del eyaculado con el gel o tapioca.

Frecuencia de las colectas de semen

Durante el primer mes de observación post-infección, la frecuencia de las colectas de semen fueron de una vez por semana; posterior a esta fecha, las colectas fueron dos veces por semana. Sin embargo, a raíz de que el grupo de animales en experimentación fue impar, los sementales números uno, dos y tres se colectaron los días 2, 7, 11, 16, 21, 25, 32, 38, 42, 45, 49, 52 y 59 post-infección (pi), y los sementales número cuatro y cinco se colectaron los días 4, 9, 14, 18, 23, 28, 38, 42, 45, 49, 52 y 59 pi.

Inoculación de los cerdos

Los cerdos fueron inoculados por la vía intranasal con 5 ml de la suspensión viral el día 0 del experimento.

Análisis de los resultados

Los resultados del volumen de los eyaculados, motilidad del semen, concentración espermática, número de espermatozoides muertos y morfología espermática fueron analizados de forma cuantitativa; el color y la consistencia del semen en forma cualitativa.

Los resultados obtenidos antes de la infección con el RVP fueron utilizados como testigos negativos.

El análisis estadístico se llevó a cabo por la técnica de t-pareada; para tal efecto, los valores promedio del volumen del eyaculado, motilidad del semen, concentración espermática, número de espermatozoides muertos y morfología espermática, obtenidos antes de la inoculación fueron confrontados con los resultados promedio obtenidos después de la infección del virus, de las variables antes descritas.

Análisis del semen

El análisis del semen se llevó a cabo en el laboratorio de virología del Departamento de Producción Animal: Cerdos (DPAC) de la UNAM.

El semen se colocó dentro de una estufa para cultivos celulares para estabilizar la temperatura [16,24].

- Color. El color y la consistencia del semen colectado se evaluaron por medio de inspección visual.
- Volumen. El volumen de la fracción más concentrada del eyaculado se cuantificó en mililitros (ml), utilizando para este caso, probetas graduadas de vidrio, limpias y estériles.
- Motilidad. El porcentaje de motilidad del semen de cada animal se determinó colocando una gota del eyaculado en un portaobjetos y sobre la gota se colocó un cubreobjetos, ambos atemperados a 37°C. Se observó a través de un microscopio de contraste de fases con un aumento de 10X, se determinó el movimiento general del eyaculado y se hizo la anotación correspondiente.
- Concentración. Para determinar la concentración espermática se utilizó una cámara de Neubauer y una pipeta para glóbulos rojos con pieza bucal [19]. Con la pipeta de eritrocitos se absorbió esperma, del eyaculado recién obtenido, exactamente hasta la marca 0.5 [10] y acto seguido solución de suero fisiológico formolado (SFF: 9 g de cloruro de sodio, 3 ml de formaldehído al 40%, agua destilada csp 1,000 ml) [37] hasta la marca 1.01 [10,19]. Con ello se diluyó el esperma 200 veces. El esperma y el medio diluyente se mezclaron uniformemente al agitar con ayuda de la perla de vidrio roja existente en la bola hueca de la pipeta. Después se tiraron las tres primeras gotas del capilar de la pipeta y se depositó una gota en cada una de las cámaras. Una vez que quedó en reposo el fluir de las

gotas, se contaron al microscopio los espermatozoides. La concentración de espermatozoides se obtuvo tras multiplicar el promedio de los espermatozoides contados, en las dos partes de la cámara, por 10 millones, para finalmente obtener el número de espermatozoides por cada ml de semen colectado.

- Espermatozoides muertos. Para calcular el número de espermatozoides muertos de cada uno de los animales en experimentación, se obtuvo una población de 1×10^6 espermatozoides del eyaculado recién colectado. Los espermatozoides fueron lavados 3 veces con 500 μ l de solución amortiguada de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés Phosphates Buffered Saline: 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.15 g de Na_2HPO_4 , 0.2 g de KH_2PO_4 , agua destilada csp 1,000 ml) y albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés Bovine Serum Albumin) al 2%. Posteriormente, se les agregó 15 μ l de PBS con ioduro de propidio (ip) (PBS-ip), a una concentración de 100 μ g de ip/ml y se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se lavaron 3 veces las muestras con 500 μ l de PBS con la finalidad de retirar el exceso de ip. Después de ser lavadas, se les agregaron 900 μ l de PBS, para que inmediatamente se leyeran en el citómetro de flujo. Para la interpretación de los resultados, se consideraron células ip positivas a todas las células muertas[3,20].

- Morfología espermática. Con el objeto de identificar a los espermatozoides anormalmente conformados, se utilizó la tinción de cristal violeta. Sobre un portaobjetos previamente templado se depositó una gota de semen y una de cristal violeta, se mezclaron ambas gotas y se realizó un frotis, semejante a los que se hacen con la sangre. El frotis se secó a temperatura ambiente y una vez desecado se realizó un examen microscópico. Se examinó un total de

100 células espermáticas para calcular el porcentaje de éstas con respecto al total de los espermatozoides contados.

Elaboración de dosis seminales

Para elaborar las dosis seminales se utilizó la solución de Beltsville Thawing Sopan (BTS: 60.0 g de D-glucosa, 3.7 de citrato de sodio, 3.7 g de EDTA, 1.2 g de bicarbonato de sodio, 500,000 U.I. de penicilina y 500 mg de estreptomina diluido en un litro de agua destilada) como diluyente del semen (1,3,18,20,22). Comúnmente, las dosis deben contener 2×10^9 espermatozoides, una motilidad espermática del 70% o superior y no más del 20% de anomalías, sin embargo, para este trabajo se usó la concentración de 3×10^9 espermatozoides, los cuales se diluyeron en 80 ml de BTS. Antes de elaborar el diluyente, los componentes del BTS se mezclaron durante 60 minutos, valiéndose de un agitador electromagnético y un matraz de vidrio graduado. Cuando los ingredientes del BTS se diluyeron por completo, el medio conservador se calentó a 37°C y acto seguido, se introdujo en una estufa para cultivo celulares, con la finalidad de estabilizar y mantener la temperatura de la solución. La dilución del semen se realizó a la media hora de recogido el eyaculado, cuando el semen y el diluyente estuvieron a la misma temperatura (35°C). Una vez elaboradas las dosis seminales, se descendió lentamente la temperatura de 37°C a 20°C y se almacenaron durante 72 horas a 20°C. El semen almacenado se rotó cada 12 horas con el objeto de mantener a los espermatozoides en suspensión con el diluyente. Se evaluó el porcentaje de motilidad de los espermatozoides contenidos en las dosis seminales a las 24, 48 y 72 horas de haber sido colectado el eyaculado.

Seguimiento serológico

Se tomaron muestras sanguíneas de los animales una vez por semana a partir de la inoculación, con la finalidad de obtener suero para

determinar la presencia de anticuerpos contra el RVP. La determinación de anticuerpos se realizó mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IH), de acuerdo a lo descrito por Ramirez et al. [29].

Aislamiento viral a partir de semen

Los aislamientos virales se realizaron a partir de las muestras de semen, plasma y espermatozoides del eyaculado de los animales colectados. Para obtener el plasma y los espermatozoides fue necesario centrifugar el semen a 200 gravedades (xg) durante 10 minutos. El sobrenadante (fracción plasmática del semen) y el sedimento (espermatozoides), se colectaron por separado. A partir de las tres fracciones (plasma, espermatozoides y semen), se realizaron dos pases en células de riñón de mono verde (VERO), sembradas en microplacas de 96 pozos con fondo plano para cultivos celulares.

En el primer pase, las muestras se diluyeron en una proporción de 1:5, se agitaron en un vortex y se centrifugaron a 950 xg durante 30 minutos. Se obtuvo el sobrenadante y se realizaron diluciones dobles hasta obtener una dilución 1:40. Se inocularon los monoestratos de células y se mantuvieron durante una hora a 37°C. Posteriormente se retiró el inóculo, se les agregaron 250 µl de Minimum Essential Medium Eagle (MEM) con el 2% de suero fetal bovino (FBS por sus siglas en inglés: Fetal Bovine Serum) y se incubaron durante 7 días a 37°C con 5% de CO₂. En cada microplaca se trabajaron 22 muestras.

El segundo pase consistió en inocular 50 µl del sobrenadante del primer pase, en un monoestrato de células VERO, sembradas 24 horas antes. Se incubaron las muestras durante una hora a 37°C, posteriormente se retiró el inóculo, se les agregaron 250 µl de MEM con el 2% de FBS y se incubaron las microplacas durante 7 días a 37°C con 5% de CO₂.

En cada uno de los dos pases se observaron los monoestratos celulares cada 24 horas y se registraron los cambios observados en las células. Se realizó la técnica de hemoaglutinación (HA) con todas las muestras trabajadas en cada uno de los dos pases y se consideró positiva la muestra que hemoaglutinó eritrocitos de ave y negativa en la que hubo sedimentación de los eritrocitos.

Titulación del virus aislado

Se realizó una mezcla de todas las muestras que resultaron positivas y posteriormente se realizó la titulación del virus mediante la técnica de hemoaglutinación. El título fue expresado en unidades hemoaglutinantes (UHA) por cada 0.05 ml de suspensión viral.

Detección del antígeno viral mediante inmunofluorescencia

A partir del segundo pase, en donde se realizaron los aislamientos virales, se llevó a cabo la detección del antígeno mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). La IFI fue estandarizada de acuerdo a lo descrito por Ceniceros[8] con la modificación de algunas variables que participan en la prueba.

Procedimiento:

1. Fijar la placa agregando 200 µl de alcohol de 96° en cada pozo.
2. Incubar durante 3 minutos.
3. Decantar el alcohol y dejar secar la placa a temperatura ambiente.
4. Agregar 50 µl de PBS con 1% de BSA en cada pozo.
5. Incubar la muestra a 37°C durante 30 minutos.
6. Lavar 3 veces cada pozo con 300 µl de PBS. Decantar el PBS de todos los pozos después de cada lavado. Evitar que la placa se seque entre los lavados.
7. Agregar 100 µl del primer anticuerpo (suero hiperinmune elaborado en conejo) diluido 1:10 en cada pozo.

8. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
9. Repetir el paso No. 6 de lavado.
10. Agregar 100 µl de conjugado (anti IgG de conejo elaborado en cabra) diluido 1:100 en cada pozo.
11. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
12. Lavar 5 veces cada pozo con 300 µl de agua destilada.
13. Agregar 50 µl de azul de Evan's en cada pozo.
14. Repetir el paso No. 12 de lavado.
15. Secar por completo la placa.
16. Observar al microscopio de luz ultravioleta.
17. Realizar la interpretación de los resultados.

Interpretación de resultados.

El *testigo positivo* debe presentar fluorescencia específica dentro del citoplasma de los cultivos infectados de un color verde brillante. Las células pueden estar organizadas en grupos, fusionadas o solas, dependiendo del daño que el virus le haya ocasionado a la monocapa de células. El *testigo negativo* no debe presentar fluorescencia dentro de las células y la monocapa de células no deberá presentar daño alguno (células fusionadas, destrucción celular, formación de sincitios, etc). Se considera *positiva* la muestra donde se observen células solas, fusionadas o en grupos con puntilleos color verde muy brillantes dentro del citoplasma. Se considera *negativa* la muestra que no presente fluorescencia específica dentro del citoplasma.

RESULTADOS

Análisis del semen

□ Color.

El color del semen de los 5 verracos antes de la inoculación con el RVP fue blanco y de consistencia cremosa. Después de la inoculación, cuatro sementales (del semental dos al cinco) mantuvieron esta característica durante todo el tiempo de experimentación (59 días).

Hasta la evaluación realizada el día 16 pi, el color del eyaculado del semental uno fue blanco y de consistencia cremosa. A los 21 días pi, el eyaculado presentó estrias de sangre; el color del semen fue café y de consistencia lechosa. A los 25 días pi, el color del semen fue café y de consistencia acuosa. A los 32 y 38 días pi, el color del semen fue café y la consistencia lechosa. A los 42 días pi, el color del semen fue beige y de consistencia lechosa. A partir del día 45 pi, el color del eyaculado fue blanco lechoso.

En el cuadro 1, se muestran los días de colecta y el color de los eyaculados de los cinco sementales durante los 59 días de observación después de la inoculación con el RVP.

□ Volumen.

Como se puede observar en el cuadro 2, los valores obtenidos del volumen del eyaculado de cada uno de los sementales, antes y después de la inoculación con el RVP, no mostraron cambios significativos ($p > 0.05$).

□ Motilidad del semen.

El promedio de la motilidad del semental uno fue de $87.2 \pm 3.6\%$; del semental dos de $86.6 \pm 4.3\%$; del semental tres de $82.5 \pm 2.6\%$; del semental cuatro de 86.1 ± 4.1 y del semental cinco de $88.8 \pm 2.2\%$. El promedio de la motilidad de los cinco sementales antes de la inoculación fue de $86.36 \pm 3.6\%$.

Después de la inoculación, la motilidad espermática en los sementales 2 al 5 no fue diferente en comparación con los datos obtenidos antes de la inoculación ($p > 0.05$). La motilidad espermática del semental uno antes del día 16 pi fue de 90%. En el día 21 pi fue de 50%; y a partir del día 25 pi fue de 0%, manteniendo este valor durante el resto de las evaluaciones.

El cuadro 3 muestra detalladamente los días de colecta, el promedio del porcentaje de motilidad antes de la inoculación y el porcentaje de motilidad de cada uno de los sementales durante el tiempo que fueron colectados después de la inoculación con el RVP.

□ Concentración.

El promedio en la concentración espermática del semental uno antes de la infección con el virus fue de 313.85 ± 12.6 millones de espermatozoides por ml. El comportamiento de la concentración espermática después de la inoculación fue variable. En el día 25 pi se contaron 93.8 millones de espermatozoides por ml de semen. En el día 32 pi se contaron 90 millones de espermatozoides por ml. En los días 38, 42, 45, 49, 52 y 59 pi, la concentración fue de 195, 205, 115, 280, 190 y 205 millones de espermatozoides por ml, respectivamente.

El promedio en la concentración espermática del semental dos antes de la infección con el RVP fue de 281.59 ± 11.2 millones de espermatozoides por ml. Después de la infección se observó un valor máximo de 400 millones de espermatozoides por ml y un valor mínimo de 255 millones de espermatozoides por ml, en los días 2 y 25 pi respectivamente.

El promedio en la concentración espermática del semental tres antes de la infección con el virus fue de 300.72 ± 13.5 millones de espermatozoides por ml. En el día 11 y 16 pi se contaron 115 y 185 millones de espermatozoides por ml de semen. Después de estas dos

evaluaciones, los valores de la concentración espermática se mantuvieron por debajo del promedio del mismo animal antes de la infección.

El promedio en la concentración espermática del semental cuatro antes de la infección con el virus fue de 308.54 ± 12.4 millones de espermatozoides por ml. Durante los primeros 18 días de infección, los valores se mantuvieron por encima del promedio. Después de esta evaluación, se observó un descenso en la concentración, la cual estuvo por debajo del promedio durante el resto del tiempo de observación.

El promedio en la concentración espermática del semental cinco antes de la infección con el virus fue de 307.63 ± 10.2 millones de espermatozoides por ml. Durante los primeros 23 días de infección, los valores se mantuvieron por encima del promedio. Entre el día 28 y 42 pi la concentración disminuyó a 280, 305 y 290 millones de espermatozoides por ml respectivamente. Los días 45, 49, 52 y 59 la concentración fue de 340, 305, 330 y 255 millones de espermatozoides por ml de semen.

Al comparar el promedio de los valores obtenidos antes de la infección con el promedio de los valores obtenidos después de la infección, se observó diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Los valores de la concentración espermática se muestran en el cuadro 4 y en la gráfica 1.

□ Espermatozoides muertos.

En el cuadro 5, se puede observar que el promedio de espermatozoides IP positivos (IP'), antes de la inoculación con el RVP, fue de $19.7 \pm 1.77\%$ del semental uno; $17.55 \pm 1.94\%$ del semental dos; $18.81 \pm 1.43\%$ del semental tres; $21.00 \pm 1.48\%$ del semental cuatro y 20.67 ± 1.09 del semental cinco. Después de la inoculación, se observó un incremento en el número de espermatozoides IP' en todos los sementales ($p < 0.05$).

Los porcentajes de espermatozoides IP' que se observaron en el semental uno después de la infección, fueron 23.06%, 26.34%, 41.16%, 37.50%, 37.14%, 80.00%, 82.07%, 82.70%, 84.70%, 91.30%, 91.25%, 96.29% y 99.08% en los días 2, 7, 11, 16, 21, 25, 32, 38, 42, 45, 49, 52 y 59 pi respectivamente.

En el semental dos, los porcentajes de espermatozoides IP' pi fueron 13.98%, 19.74%, 20.36%, 23.24%, 34.20%, 30.16%, 30.04%, 30.00%, 30.56%, 32.60%, 29.31%, 30.44% y 27.97% en los días 2, 7, 11, 16, 21, 25, 32, 38, 42, 45, 49, 52 y 59 pi respectivamente.

En el semental tres, los porcentajes de espermatozoides IP' pi fueron 15.32%, 23.56%, 48.86%, 31.22%, 32.00%, 29.56%, 30.79%, 31.20%, 20.28%, 20.95%, 39.17%, 39.56% y 38.67% en los días 2, 7, 11, 16, 21, 25, 32, 38, 42, 45, 49, 52 y 59 pi respectivamente.

En el semental cuatro, los porcentajes de espermatozoides IP' pi fueron 23.19%, 17.18%, 21.44%, 21.05%, 20.92%, 19.34%, 26.12%, 28.38%, 35.83%, 35.91%, 37.46% y 37.09% en los días 4, 9, 14, 18, 23, 28, 38, 42, 45, 49, 52 y 59 pi respectivamente.

En el semental cinco, los porcentajes de espermatozoides IP' después de la inoculación fueron 21.00%, 24.76%, 29.04%, 31.02%, 31.68%, 37.50%, 35.91%, 35.38%, 38.86%, 27.04%, 28.03% y 25.28% en los días 4, 9, 14, 18, 23, 28, 38, 42, 45, 49, 52 y 59 pi respectivamente.

La gráfica 2 muestra los valores promedio de los espermatozoides IP' antes de la inoculación y el comportamiento de cada semental durante el período de observación.

□ Morfología espermática.

El porcentaje de anomalías de los cinco sementales antes de la inoculación con el RVP fue de 13.31 ± 0.87 %. Sin embargo, se pudo observar que después de la inoculación, el porcentaje de anomalías se incrementó ($p < 0.05$). En el cuadro 6 y en la gráfica 3, se puede

observar el comportamiento de este fenómeno antes y después de la inoculación de los sementales.

Evaluación de la motilidad del semen diluido en BTS

*** Evaluación a las 24 horas.**

Antes de la inoculación con el RVP, el promedio de la motilidad del semen diluido en BTS y analizado 24 horas después, fue de $77.36 \pm 3.4\%$. A partir del día 17 pi, se observó un fuerte descenso en la motilidad espermática de los sementales uno, dos y tres, pasando del 73.3% de motilidad promedio (en la evaluación del día 12 pi, correspondiente a una evaluación anterior) a 20% en cada uno de los sementales. En los sementales cuatro y cinco se observó un descenso en la motilidad a partir del día 19 pi, pasando de 80% de motilidad promedio (que correspondió a una evaluación anterior) a 60 y 30% respectivamente ($p < 0.05$). En el cuadro 7, se puede observar el promedio de la motilidad del semen diluido antes de la inoculación, y el comportamiento después de la inoculación con el RVP.

*** Evaluación a las 48 horas.**

Antes de la inoculación con el RVP, el promedio de la motilidad del semen diluido en BTS y analizado 48 horas después fue de $70.25 \pm 4.7\%$. En el día 16 pi, los sementales cuatro y cinco presentaron una motilidad espermática de 0%. En los sementales uno y tres se observó el comportamiento anteriormente descrito a partir del día 18 pi. En el semental dos se observó esta característica hasta el día 23 pi ($p < 0.05$). En el cuadro 7, se puede observar el promedio de la motilidad del semen diluido antes de la inoculación con el RVP y su comportamiento durante el tiempo de observación.

* Evaluación a las 72 horas.

Antes de la inoculación con el RVP, el promedio de la motilidad del semen diluido en BTS y analizado 72 horas después fue de $63.00 \pm 4.1\%$. Entre los días 14 y 17 pi, los cinco sementales presentaron 0% de motilidad en el semen diluido en BTS ($p < 0.05$). En el cuadro 7 se puede observar el promedio de la motilidad del semen diluido antes de la inoculación y su comportamiento durante el periodo de observación.

Seguimiento serológico

En el cuadro 8, se observa el título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra la enfermedad del ojo azul, los cuales fueron detectados por primera vez a partir de los días 7, 9, 31 y 56 pi.

Aislamientos virales

▪ Primer pase.

Semen.

Al realizar la inspección ocular de las monocapas de células, se apreció efecto citopático (ECP) en 29 muestras. Las 34 muestras restantes resultaron negativas por esta técnica. El ECP consistió en células redondas, que correspondieron a células muertas. Al realizar la técnica de HA, se observó aglutinación principalmente en las dos diluciones más altas (1:20 y 1:40). Por esta técnica se observaron 14 muestras positivas y 49 negativas. Al comparar el ECP vs la HA y evaluar la proporción global de las técnicas ante un mismo fenómeno y el grado de concordancia no aleatoria existente entre mediciones de la misma categoría estudiada, se obtuvieron los siguientes valores: sensibilidad (S) = 100%, especificidad (E) = 69.39%, índice de concordancia (IC) = 79.19% y Kappa = 0.5018 (Cuadro 9).

Como se muestra en el cuadro 10, el RVP se recuperó a partir del día 7 de infección en los sementales uno y dos, y en los días 9, 14 y 19 pi de los sementales número cuatro, cinco y tres respectivamente.

Espermatozoides.

Al realizar la inspección ocular de las monocapas de células, se observaron 29 muestras con ECP y 34 muestras sin ECP. El ECP consistió en células redondas y células fusionadas. Al realizar la técnica de HA, se observó aglutinación en las tres diluciones más altas (1:10, 1:20, y 1:40) de algunas de las muestras que resultaron positivas. Por esta técnica se observaron 10 muestras positivas y 53 negativas. Al comparar el ECP vs la HA y evaluar la proporción global de las técnicas ante un mismo fenómeno y el grado de concordancia no aleatoria existente entre mediciones de la misma categoría estudiada, se obtuvieron los siguientes valores: S = 100%, E = 64.15%, IC = 69.84% y Kappa = 0.3623 (Cuadro 11). El virus se pudo recuperar por primera vez a partir del día 7, 9, 11, 14 y 64 de los sementales uno, cuatro, dos, cinco y tres respectivamente. En el cuadro 12 se pueden apreciar los días en los cuales se pudo recuperar al RVP durante todo el tiempo de observación.

Plasma.

A la inspección ocular, se observaron 31 muestras con ECP y 32 muestras negativas por esta técnica. El ECP consistió en células redondas, en menor proporción destrucción celular y células fusionadas. Al realizar la técnica de HA, se observaron 15 muestras que aglutinaron los eritrocitos de ave en las tres diluciones más altas (1:10, 1:20, y 1:40), las 48 muestras restantes fueron negativas. Al comparar el ECP vs la HA y evaluar la proporción global de las técnicas ante un mismo fenómeno y el grado de concordancia no aleatoria existente entre mediciones de la misma categoría estudiada, se obtuvieron los siguientes valores: S = 100%, E = 66.66%, IC = 74.60% y Kappa = 0.4878 (Cuadro 13).

El virus se pudo recuperar por primera vez a partir de los días 2, 11, 14, y 16., correspondientes a los sementales número 1, 2, 5 y 3 respectivamente (Cuadro 14).

▪ Segundo pase.

Semen.

Al realizar la inspección ocular del monoestrato celular, se observaron células fusionadas, destrucción celular, sincitios y células aisladas. Las fotografías 1 y 2 muestran el daño celular observado. Al realizar la HA, se observó que las muestras positivas aglutinaron las cuatro diluciones (1:5, 1:10, 1:20 y 1:40). La aglutinación correspondió a las 14 muestras en las cuales se observó daño celular. Al comparar el ECP vs la HA y evaluar la proporción global de las técnicas ante un mismo fenómeno y el grado de concordancia no aleatoria existente entre mediciones de la misma categoría estudiada, se obtuvieron los siguientes valores: S = 100%, E = 100%, IC = 100% y Kappa = 1 (Cuadro 15).

En el cuadro 16, se pueden apreciar los días en los cuales se pudo recuperar al RVP durante el tiempo de observación.

Espermatozoides.

Al realizar la inspección ocular de la monocapa de células, se observaron células fusionadas, destrucción celular, sincitios, células aisladas y células redondas. Al realizar la HA, se observó que las muestras positivas aglutinaron las cuatro diluciones. La aglutinación correspondió a las 10 muestras en las cuales se observó daño celular. Al comparar el ECP y la HA y evaluar la proporción global de las técnicas ante un mismo fenómeno y el grado de concordancia no aleatoria existente entre mediciones de la misma categoría estudiada, se obtuvieron los siguientes valores: S = 100%, E = 100%, IC = 100% y Kappa = 1 (Cuadro 17).

En el cuadro 18, se pueden observar los días en que se pudo recuperar el virus de la fracción espermática durante el tiempo de monitoreo.

Plasma.

Al realizar la inspección ocular de las células, se observó destrucción celular, células fusionadas, sincitios, células aisladas y células redondas. Al realizar la HA, se observó que las muestras positivas aglutinaron las cuatro diluciones. La aglutinación correspondió a las 17 muestras en las cuales se observó daño celular. Al comparar el ECP y la HA y evaluar la proporción global de las técnicas ante un mismo fenómeno y el grado de concordancia no aleatoria existente entre mediciones de la misma categoría estudiada, se obtuvieron los siguientes valores: S = 100%, E = 100%, IC = 100% y Kappa = 1 (Cuadro 19).

El cuadro 20, muestra los días en que se pudo recuperar el virus de la fracción plasmática durante el tiempo de monitoreo de los animales.

Titulación del RVP aislado

Semen.

La cantidad de virus eliminado a partir de las muestras de semen fue variable. Durante el tiempo de observación se pudieron observar títulos de 2 hasta 256 UHA. En el cuadro 21 se muestra el título viral de las muestras que resultaron positivas en los dos pases, de cada uno de los cinco sementales.

Espermatozoides.

En todos los sementales se pudo recuperar el virus. Durante el tiempo de observación se observaron títulos de 4 hasta 128 UHA. En el cuadro 22 se muestra el título viral de las muestras que resultaron positivas en los dos pases, de cada uno de los cinco sementales.

□ Plasma.

La cantidad de virus recuperado a partir de la fracción plasmática del semen fue constante y con títulos de 4 UHA hasta 32 UHA. En el cuadro 23 se pueden observar los días de colecta del semen, las muestras que resultaron positivas a la hemoaglutinación en los dos pases y los títulos del *rubulavirus porcino*.

Detección del antígeno viral mediante inmunofluorescencia

□ Semen.

Al realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en las monocapas en donde se había realizado con anterioridad el segundo pase de los aislamientos del RVP, se observaron 14 muestras positivas y 49 negativas. Los datos correspondieron con los resultados obtenidos por la técnica de HA. Al comparar la HA y la IFI y evaluar la proporción global de las técnicas ante un mismo fenómeno y el grado de concordancia no aleatoria existente entre mediciones de la misma categoría estudiada, se obtuvieron los siguientes resultados: $S = 100\%$, $E = 100\%$, $IC = 100\%$ y $Kappa = 1$ (Cuadro 24).

□ Espermatozoides.

Al realizar la técnica de IFI, se observaron 12 muestras positivas y 51 negativas. Sin embargo, la técnica de HA arrojó 10 muestras positivas y 53 negativas. Al comparar la HA y la IFI y evaluar la proporción global de las técnicas ante un mismo fenómeno y el grado de concordancia no aleatoria existente entre mediciones de la misma categoría estudiada, se obtuvieron los siguientes resultados: $S = 83.33\%$, $E = 100\%$, $IC = 96.83\%$ y $Kappa = 0.8901$ (Cuadro 25).

□ Plasma.

Al realizar la técnica de IFI, se observaron 17 muestras positivas y 46 negativas. Estos datos correspondieron con los resultados obtenidos por

la técnica de HA. Al comparar la HA y la IFI y evaluar la proporción global de las técnicas ante un mismo fenómeno y el grado de concordancia no aleatoria existente entre mediciones de la misma categoría estudiada, se obtuvieron los siguientes resultados: S = 100%, E = 100%, IC = 100% y Kappa = 1 (Cuadro 26).

En el cuadro 27, se pueden observar los resultados de las muestras de semen, de la fracción espermática y de la fracción plasmática en donde se pudieron identificar los sitios antigénicos del RVP por la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Las fotografías 3, 4 y 5 muestran la identificación del *rubulavirus porcino* (RVP) en cultivos de células VERO por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

DISCUSIÓN

Al evaluar el volumen del eyaculado se observó que los valores obtenidos antes de la inoculación no mostraron diferencias con los que se obtuvieron durante el período de observación. Lo anterior es debido a que las glándulas accesorias no pierden su actividad secretora después de la infección con el *rubulavirus porcino* (RVP), aun cuando las dimensiones de los testículos en uno de los verracos se vieron incrementadas seriamente. Esto confirma que cada animal es capaz de establecer una respuesta diferente en contra del agente infeccioso[28].

Campos et al.[5] dieron un panorama general de los trastornos que sufren los verracos ante un brote de ojo azul y describieron que la infección de los verracos está relacionada con los animales de raza pura; además señalaron que algunas de las características del semen se ven afectadas en muy baja proporción (azoospermia, motilidad 0 y sangre en el semen). En 1998, Ramírez observó que alrededor del día 30 de infección, el eyaculado de los sementales infectados experimentalmente con el RVP no presentó cambios en el volumen pero careció de espermatozoides y lo relacionó con el incremento del tamaño de los testículos y con la aparición de granulomas en la cabeza del epidídimo, los cuales ocasionan azoospermia obstructiva de los conductos epididimarios e impiden el libre tránsito de los espermatozoides y que se ve reflejado en el momento de la colecta[28]. Estos dos fenómenos fueron observados en cinco colectas de sólo uno de los animales en estudio.

Al evaluar los espermatozoides muertos y los anormalmente conformados se observó un incremento considerable en todos los animales; sin embargo, al evaluar la motilidad espermática sólo se observó esta alteración en el semental uno (el que presentó un incremento considerable en las dimensiones testiculares). Estos resultados dan la pauta para afirmar

que la disminución en la viabilidad espermática está directamente relacionada con la falta de maduración de los espermatozoides en el epidídimo, pues los cambios degenerativos que ocasiona el RVF, como la formación de granulomas espermáticos, degeneración vacuolar, infiltración de células mononucleares, fibroplasia intersticial, degeneración de los túbulos seminíferos, pérdida parcial de los estereocilios, infiltración linfocítica, formación de células gigantes, fibrosis y necrosis licuefactiva[28,30], provocan que el epidídimo pierda la capacidad de proveer los cambios fisiológicos y fisicoquímicos que los espermatozoides necesitan para llegar a la maduración y que son necesarios para llevar a cabo la fertilización de un huevo u oocito[28]. Al evaluar la motilidad de las dosis seminales, se observó un descenso drástico en las dosis elaboradas después del día 15 de infección. Esto último puede ser relacionado con lo descrito por Ramírez MH en 1998, quien demostró que a partir del día 15 de infección los animales presentan granulomas en el epidídimo de diferentes tamaños[28]. La disfunción epididimaria se ha relacionado con la alteración de la calidad seminal, que incluye el aumento de defectos morfológicos y acinesia. Los defectos morfológicos de esperma se han relacionado también con la degeneración del epitelio epididimario. Los toros, carneros y perros con epididimitis intersticial microscópica con frecuencia presentan una disfunción en la calidad seminal, incluyendo un porcentaje alto de espermatozoides con defectos morfológicos[26]. Cabe recordar que durante la migración a lo largo del epidídimo, los espermatozoides desarrollan motilidad progresiva, cambio en el sustrato metabólico, aumento de la gravedad específica, cambios en el fluido circundante de los espermatozoides, especialmente sodio, potasio cloruro, aminoácidos, proteínas, fosfolípidos y enzimas, y al verse

afectados algunos de los fenómenos fisicoquímicos, la calidad y viabilidad del semen se ven afectados[26].

Los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación fueron identificados por primera vez en cuatro de los cinco animales antes del día 11 de infección; sin embargo, en el animal que desarrolló un granuloma a nivel testicular (semental uno) se detectaron por primera vez hasta el día 56 de infección. Lo señalado es muy similar con lo descrito por Hernández L. J. en 1997, quien describió que en algunos cerdos infectados con el RVP, la proliferación de las células mononucleares (CMN) disminuyó cuando éstos presentaron el desarrollo de un granuloma a nivel testicular. También describió que el conteo de CMN se mantuvieron dentro de los parámetros normales en los cerdos infectados que no desarrollaron el granuloma. Lo anterior explica por qué los cerdos desarrollan anticuerpos a diferente momento de la infección con el RVP y refleja que cada cerdo es capaz de montar una respuesta inmunológica diferente en presencia del RVP[13]. Los títulos de anticuerpos fueron muy similares a los observados después de haber ocurrido un brote epizoótico de la EOA[12].

En los humanos, el papel del ácido siálico ha sido relacionado con la maduración de los espermatozoides en el epidídimo y en el mantenimiento del balance iónico entre el epidídimo y la estabilización del acrosoma de los espermatozoides[20,43]. En ratas albinas, las moléculas de ácido siálico se han encontrado en todas las partes del aparato reproductor y han sido relacionadas con los niveles de andrógenos contenidos en el epidídimo y las glándulas accesorias[27]. En estudios recientes se ha evaluado el papel que juegan las moléculas de ácido siálico como receptores específicos del RVP. El uso de la lectina Maackia amurensis ha demostrado que la expresión de las moléculas de ácido siálico con enlaces $\alpha 2,3$ (sialil $\alpha 2,3$ galactosa) en la superficie de las células es

indispensable para que se realice el proceso de infección con el RVP[33, 35]. En este trabajo, se pudo observar que los aislamientos del RVP a partir de las muestras de la fracción plasmática del semen, fue más constante en la fracción celular que en las muestras de semen. Este fenómeno fue muy similar a lo descrito por Ramirez en 1998, quien determinó que el RVP se puede aislar de manera constante y con mayor frecuencia a partir de las glándulas bulbouretrales, en comparación con testículo y epidídimo[28]. Lo anterior está relacionado con la presencia de las moléculas de ácido siálico en el tracto reproductor de los cerdos adultos[33].

Para realizar los aislamientos de los virus que se eliminan en semen, se han empleado diferentes técnicas que han tenido como objeto disminuir la toxicidad que el semen le ocasiona a los monoestratos de células; por tal motivo se han hecho esfuerzos por desarrollar una técnica que incluye el uso de caolín, con la cual se asegura que se disminuye la toxicidad del semen[36]. Sin embargo, en este trabajo se pudo demostrar que al diluir con MEM a las muestras de semen, se eliminó su toxicidad. El empleo de la técnica de inmunofluorescencia (IF) contribuyó a identificar muestras que habían resultado negativas al aislamiento viral. Este fenómeno se debe a que tiene una elevada sensibilidad en la detección de pequeñas cantidades de antígeno; por tal motivo, es una herramienta que proporciona datos confiables como método de diagnóstico. La importancia clínica de la enfermedad radica en los animales que han sufrido la infección con el RVP pero que no presentan signos clínicos aparentes. Esta característica de la enfermedad dificulta identificar a los verracos afectados con el padecimiento y explica cómo participan los sementales en la presentación del regreso al estro en las cerdas, porque se ha demostrado que los sementales que aparentemente no son afectados, al evaluar las características microscópicas del semen se ven seriamente

afectados, disminuyendo su viabilidad. También se ha demostrado que la calidad del semen se ve afectada desde el momento de la colecta al evaluar a los verracos que presentan una alteración muy marcada en las dimensiones testiculares. Esto último permite tomar la decisión de eliminar a los verracos que presenten orquitis y alteraciones en la calidad del semen en las explotaciones porcinas.

CONCLUSIONES

1. Los signos clínicos de la enfermedad del ojo azul fueron reproducidos experimentalmente en verracos inoculados intranasalmente con el *rubulavirus porcino* de la cepa PAC-III.
2. Al evaluar las características del semen de un verraco con orquitis se observaron cambios en el color, consistencia, motilidad, concentración, espermatozoides muertos y anomalidades espermáticas.
3. En los verracos sin orquitis, se afectaron en menor proporción las características del semen, observándose cambios en la concentración, el número de espermatozoides muertos y anomalidades espermáticas.
4. La viabilidad del semen diluido en la solución de BTS y evaluada a las 24 horas, se vio afectada en todos los animales después del día 11 de infección.
5. Se pudo aislar el virus entre los 2-49 días de infección de las muestras de semen, fracción plasmática y espermática.
6. La combinación entre las alteraciones en los parámetros del semen y la eliminación del virus por esta misma vía, explica cómo participa el macho en la presentación del regreso al estro en las hembras y cómo el macho puede ser el causante de la diseminación de la enfermedad en la piara.

PERSPECTIVAS

1. Comprobar si el semen procedente de verracos infectados con el *rubulavirus porcino* puede diseminar la enfermedad por vía venérea a las hembras o si sólo influye en el regreso al estro, disminuyendo el número de partos por año.

LITERATURA CITADA

1. Alireza F, Willwm JH, Freng-Pang C, Wim FV, Abraham M, Mart MB, Ben C. Acrozome-Intact Board Spermatozoa Initiate Binding to the Homologus Zona Pellucida In Vitro. Biology reproduction. 1997;56:430-438.
2. Allan GM, McNeilly F, Walker I, Linné T, Moreno-López J, Hernández P, Kennedy S, Carroll BP, Herron H, Foster JC, Adair A. Sequential study of experimental paramixovirus (LPMV) infection of pigs. Immunostaining of cryostat and virus isolation. J. Vet. Diagn. Invest. 1996;8:405-413.
3. Ashworth PJC, Harrison RAP, Miller NGA, Plummer JM, Watson PF. Flow cytometric detection of bicarbonate-induced changes in lectins binding in board and ram sperm populations. Molecular reproduction and development. 1995;40:164-176.
4. Britt JH, Almond GW, Flowers WL. Diseases of the reproductive system. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, (Eds) Disease of swine. Iowa University Press, Ames, Iowa U.S.A. 1999:883 - 911.
5. Campos HR, Carvajal SM. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. En: Avances de producción porcina. Vol. 1. pp. 243-244.
6. Carreón NR, Fuentes MR. Frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos del altiplano y norte de México. Veterinaria México 1991;2:117-179.
7. Castañeda MJ, Becerril AJ, Valencia MJ. Efecto de la adición de progesterona al semen de verraco antes de la congelación o después de la descongelación sobre la fertilidad, morfología acrosomal y motilidad de los espermatozoides. Veterinaria México. 1996;27:11-16.

8. Ceniceros RMA, Retana RA, Gómez SJJ. Diagnóstico de hepatitis con cuerpos de inclusión mediante la prueba de inmunofluorescencia. *Veterinaria México*. 1992;4:333-335
9. Cuetero RS, Ramírez MH, Carreón NR, Campuzano GJ. Inoculación experimental del paramixovirus de ojo azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar), vía intramuscular. *Veterinaria México*. 1995;26:231-235.
10. Flores JAM, Agraz AAG. Ganado porcino. Cría y explotación. *Enfermedades e industrialización*. Editorial Limusa. 4ª Edición. Tomo 1. México DF. 1986:394.
11. Fuentes JR, Gay MG, Herradora LM, Retana AR. Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad, inocuidad, potencia y medición de la inmunidad pasiva en lechones. *Veterinaria México*. 1994;25:243-247.
12. Hernández JP, Sundquist A, Fuentes M, Díaz AO, Reyes JL, Hernández EB, Moreno JL. Correlación entre las pruebas de Virus Neutralización, Inhibición de la Hemoaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el Paramixovirus del Síndrome del Ojo Azul en cerdos. *Veterinaria México*. 1992;3:217-222.
13. Hernández LJ. Estudio de la respuesta inmune celular y humoral en cerdos infectados experimentalmente con el rubulavirus porcino. Tesis de Maestría, México DF. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 1997.
14. Herrick JB, Self HL. Evaluación de la fertilidad del toro y del verraco. Ed. Acriba. pp. 66-76.
15. Hopkins SM, Evans LE, Inseminación artificial. In: McDonald LE, *Endocrinología veterinaria y reproducción*. Cuarta Edición. Ed. Interamericana McGraw-Hill. 1991:345-378.

16. Hughes PE, Varley MA. Reproducción del cerdo. Ed. Acriba. 1984:222-235
17. Huneycutt BS, Plakhov IV, Bartido SM, Huang A, Reiss S, Aoki C. Distribution of vesicular stomatitis virus proteins in the brain of BALB/c mice following intranasal incubation: an immunohistochemical analysis. Brain Res. 1994;635:81-95.
18. Hurtgen J, Grabo BO, Lemman AD. Fertility examination of boards. Proceeding of the annual meeting of the society for theriogenology. St. Paul, Minnesota. 1997:11-17.
19. König H, Sèller, Henze A, Conrard F. Inseminación de la cerda. Ed. Acriba. 1979:71.
20. Lassalle B, Testart J. Lectins binding on human sperm surface increase membrane permeability and stimulate acrosomal exocytosis. Molecular reproduction and development. 1996;9:1-8.
21. Levinsky H, Allalouf D, Sagiv M, Barnet M, Singer R. Sialic acid content of human spermatozoa in relation to age and quality of sperm. Int. J. Fertil. 1988;33:68-71.
22. Manual de inseminación artificial. MCL. Al. Center Laboratory Routine. Technical procedures for use of liquid board semen. Preparation of diluent.
23. Manual de inseminación artificial porcina. Ed. Kubus S. A.
24. Martín SR. Nuevas perspectivas en inseminación artificial para mejorar resultados productivos. Memorias de la II Reunión anual de producción porcina. Ciudad Obregón, Sonora. 1997.
25. Moreno-López J, Correa-Girón P, Martínez A, Ericsson A. Characterization of a Paramyxovirus Isolated from the Brain of a Piglet in Mexico. Archives of Virology. 1986;91:221-231.

26. Pineda HL. Reproducción del macho. In: McDonald LE. Endocrinología veterinaria y reproducción. Cuarta Edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. 1991:253-293.
27. Rajalakshmi M, Prasad MRM. Changes in the sialic acid content of the accessory glands of the male rats. J. Endocr. 1968;41:471-476.
28. Ramírez MH. Fisiopatología del paramixovirus del ojo azul a nivel testicular. Tesis de doctorado. México DF. UNAM. 1998.
29. Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez TJ. Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del Paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. Veterinaria México. 1996;27:257-259.
30. Ramírez HM, Hernández-Jauregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-López J, Kennedy S. Lesions in the Reproductive Tract of Board Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus. J. Comp. Path. 1977;117:237-252.
31. Ramírez MH, Martínez GR, Vizuet AO, Monrroy BJ. Inoculación del virus de la enfermedad del ojo azul en verracos de la raza Pelón Mexicano. Veterinaria México. 1999;1:1-6.
32. Ramírez-Herrera MA, Mendoza-Magaña ML, Dueñas SH. Experimental Infection of Swine and Cat Central Nervous Systems by the Pig Paramixovirus of the Blue Eye Disease. J. Vet. Med. Serie-B 1997;44:461-476.
33. Reyes LJ. Mecanismos de respuesta al Paramixovirus Porcino LPM (tesis de doctorado). México DF. Universidad Nacional Autónoma de México. Enero. 1998.
34. Reyes-Leyva J, Ramírez H, Hernández MJ, Sánchez ME, Rodríguez J, Mercado C, Carreón R, Adair B, Herron B, Alan G, Kennedy S, Zenteno E, Hernández-Jauregui. Sistema olfatorio vía de ingreso del rubulavirus porcino al sistema nervioso central I. Infección

- experimental y detección de antígeno. P. *Virology Primera Reunión Nacional de Virología*. REVISTA BIOMEDICA. 2000. <http://www.uady.mx/~biomedic/rb97828.html>
35. Reyes-Leyva J, Sánchez ME, SantosG, Hernández-Jauregui P, Zenteno, E. Sistema olfatorio via de ingreso del rubulavirus porcino al sistema nervioso central II. Distribución de los ácidos siálicos. P. *Virology Primera Reunión Nacional de Virología*. REVISTA BIOMEDICA. 2000. <http://www.uady.mx/~biomedic/rb97828.html>
 36. Richmond JY. Preadorption of Board Semen with Kaolin: Increased Efficiency of Foot and Mouth Diseases Virus Detection. *Am. J. Vet Res.* 1978;39:1612-1616.
 37. Sthepano HA. Blue eye diseases. In: Leman AD, Straw BF, Mengeling WL, Allaire AD, Taylor DJ. (Eds), *Diseases of swine*. Iowa State University Press, Ames, IA. 1994:237-241.
 38. Stephano HA. Blue eye disease. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. (Eds) *Disease of swine*. Iowa University Press, Ames, Iowa U.S.A. 1999:103-112.
 39. Stephano HA, Gay GA, Ramírez TC, Maqueda AJJ. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemoaglutinante. *Memorias del 17th Congr. Assoc. Mex. Vet. Esp. Cerdos*. Puerto Vallarta. 1981:43.
 40. Stéphane HA, Gay GM, Ramírez TC. Encephalomyelitis, Reproductive Failure and Corneal Opacity (Blue Eye) in Pigs, Associate with a Paramixovirus Infection. *Vet. Rec.* 1988:112:6.
 41. Suárez P. Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus. *Vet Res.* 2000;31:47-55.
 42. Sundquist A, Berg M, Hernández-Jauregui P, Linné T, Moreno-López J. The structural proteins of porcine paramixovirus (LPMV). *J. Gen. Virol.* 1990;168:291-196.

43. Toowicharanont P, Chulavatnatol M. Direct assay of sialic acids on rat spermatozoa from the caput and cauda epididymidis. J. Reprod. Fert. 1983;67:275-280.
44. Virus taxonomy. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>
45. Zermeño MF. Evaluación de las características testiculares y seminales después de un brote de la enfermedad del ojo azul por paramixovirus en verracos, tesis de licenciatura. México DF. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 1994.

Cuadros

Cuadro 1.- Días de colecta, color y consistencia del semen de cada uno de los animales después de la inoculación con el *rubulavirus porcino*.

Número Animal	Días post-inoculación																			
	2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59	
1	B	-	B	-	B	-	B	-	C*	-	C**	-	C**	C***	C****	B*	B	B	B	B
2	B	-	B	-	B	-	B	-	B	-	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B
3	B	-	B	-	B	-	B	-	B	-	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B
4	-	B	-	B	-	B	-	B	-	B	-	B	-	B	B	B	B	B	B	B
5	-	B	-	B	-	B	-	B	-	B	-	B	-	B	B	B	B	B	B	B

Donde :

B semen color blanco y de consistencia cremosa

C semen color café con estrías de sangre y de consistencia lechosa.*

*C** semen color café y de consistencia acuosa (traslúcido con apariencia de agua de tamarindo)*

*C*** semen color café traslucido con apariencia a café con leche*

*C**** semen color beige muy tenue con apariencia traslucida*

B semen color blanco traslúcido con apariencia de agua de horchata*

45

Cuadro 2.- Volumen del eyaculado de cada uno de los sementales antes y después de la inoculación con el RVP.

No. de semental	Periodo	Volumen (ml)
1*	Antes	287.08
	Después	236.11
	Diferencia	50.97
2*	Antes	278.32
	Después	265.47
	Diferencia	12.85
3*	Antes	314.72
	Después	325.70
	Diferencia	10.98
4*	Antes	258.31
	Después	238.82
	Diferencia	19.46
5*	Antes	274.34
	Después	244.17
	Diferencia	30.17

* No se encontró diferencia estadística ($P > 0.05$)

46

Cuadro 3.- Promedio de la motilidad antes de la inoculación, días de colecta y motilidad espermática de cada uno de los animales durante el tiempo de observación (59 días).

Número Animal	promedio antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1 ^k	87.2±3.6%	90	-	90	-	90	-	90	-	50 ^{ak}	-	0 ^k	-	0 ^k						
2 ^{**}	86.6±4.3%	90	-	90	-	90	-	90	-	90	-	90	-	90	90	90	90	90	90	90
3 ^{**}	82.5±2.6%	90	-	90	-	90	-	90	-	90	-	85	-	90	80	80	85	85	90	90
4 ^{**}	86.1±4.1%	-	90	-	90	-	90	-	90	-	90	-	90	-	90	90	90	80	90	90
5 ^{**}	88.8±2.2%	-	90	-	90	-	90	-	90	-	90	-	90	-	85	90	90	85	90	90

Donde: La motilidad esta expresada en porcentaje.

* La motilidad espermática de este animal no es la óptima para realizar dosis seminales, sin embargo se realizaron las dosis con la finalidad de conocer cuál era la motilidad del semen diluido.

** No se encontró diferencia estadística (P>0.05).

& Se observó diferencia estadística significativa (P<0.05).

47

Cuadro 4.- Promedio de la concentración espermática de los cinco semetales antes de la inoculación con el RVP y valores obtenidos durante el periodo de observación (59 días post-infección).

No. de semental	1*	2*	3*	4*	5*
Promedio antes.	313.85±12.6	281.59±11.2	300.72±13.5	308.54±12.4	307.63±10.2
día 2 pi.	380	400	330	---	---
día 4 pi.	---	---	---	460	300
día 7 pi.	350	345	310	---	---
día 9 pi.	---	---	---	435	295
día 11 pi.	375	295	115	---	---
día 14 pi.	---	---	---	370	360
día 16 pi.	205	309	185	---	---
día 18 pi.	---	---	---	460	355
día 21 pi.	310	345	260	---	---
día 23 pi.	---	---	---	270	335
día 25 pi.	93.8	255	205	---	---
día 28 pi.	---	---	---	285	280
día 32 pi.	90	265	280	---	---
día 38 pi.	195	315	285	325	305
día 42 pi.	205	325	240	265	290
día 45 pi.	115	275	230	320	340
día 49 pi.	280	280	290	310	305
día 52 pi.	190	270	285	305	330
día 59 pi.	205	290	285	280	255

Donde: --- significa no evaluado.

* Se observó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

48

Cuadro 5.- Promedio de los espermatozoides muertos de cada uno de los sementales antes de la inoculación con el RVP, días de colecta y número de espermatozoides muertos durante el tiempo de observación.

No. de semental	1*	2*	3*	4*	5*
Promedio de antes.	19.70 ± 1.77	17.55 ± 1.94	18.81 ± 1.43	21.00 ± 1.48	20.67 ± 1.09
día 2 pi.	23.06	13.98	15.32	---	---
día 4 pi.	---	---	---	23.19	21.00
día 7 pi.	26.34	19.74	23.56	---	---
día 9 pi.	---	---	---	17.18	24.76
día 11 pi.	41.16	20.36	48.86	---	---
día 14 pi.	---	---	---	21.44	29.04
día 16 pi.	37.50	23.24	31.22	---	---
día 18 pi.	---	---	---	21.05	31.02
día 21 pi.	37.14	34.20	32.00	---	---
día 23 pi.	---	---	---	20.92	31.68
día 25 pi.	80.00	30.16	29.56	---	---
día 28 pi.	---	---	---	19.34	37.50
día 32 pi.	82.07	30.04	30.79	---	---
día 38 pi.	82.70	30.00	31.20	26.12	35.91
día 42 pi.	84.70	30.56	20.28	28.38	35.38
día 45 pi.	91.30	32.60	20.95	35.83	38.86
día 49 pi.	91.25	29.31	39.17	35.91	27.04
día 52 pi.	96.29	30.44	39.56	37.46	28.63
día 59 pi.	99.08	27.97	38.67	37.09	25.28

Donde: --- significa no evaluado.

* Se observó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

49

Cuadro 6.- Porcentaje de anomalías presentes en el eyaculado de cada uno de los sementales antes y después de la inoculación.

No. de semental	Periodo	Porcentaje de anomalías
1*	Antes	12.45 ± 1.2
	Después	60.55 ± 32.6
	Diferencia	48.10
2*	Antes	12.80 ± 0.9
	Después	24.82 ± 12.3
	Diferencia	12.02
3*	Antes	13.60 ± 1.0
	Después	26.58 ± 16.3
	Diferencia	12.98
4*	Antes	13.50 ± 0.9
	Después	33.64 ± 19.2
	Diferencia	20.14
5*	Antes	14.31 ± 1.0
	Después	23.94 ± 16.9
	Diferencia	9.63

* Se observó diferencia estadística significativa (P<0.05).

50

Cuadro 7.- Promedio de la motilidad del semen diluido y evaluado a las 24, 48 y 72 horas antes de la inoculación con el RVP, días de colecta y motilidad espermática post-infección.

Número seminal	promedio antes	Evaluación a las 24 horas post-inoculación																		
		3	5	8	10	12	15	17	19	22	24	26	29	33	39	43	46	50	53	60
1*	78.7±2.5%	80	-	80	-	70	-	20	-	nd*	-	nd*	-	nd*						
2*	78.5±2.5%	80	-	80	-	80	-	20	-	20	-	0	-	0	20	0	10	10	20	30
3*	73.7±4.7%	85	-	80	-	70	-	20	-	20	-	0	-	0	10	0	0	10	10	20
4*	78.7±2.5%	-	80	-	80	-	80	-	60	-	0	-	0	-	20	0	0	0	10	10
5*	76.2±2.5%	-	85	-	70	-	80	-	30	-	30	-	10	-	30	10	10	30	30	40
Número seminal	promedio antes	Evaluación a las 48 horas post-inoculación																		
		4	6	9	11	13	16	18	20	23	25	27	30	34	40	44	47	51	54	61
1*	71.2±2.5%	75	-	65	-	50	-	0	-	nd*	-	nd*	-	nd*						
2*	72.5±6.4%	70	-	70	-	70	-	10	-	0	-	0	-	0	0	0	0	0	0	0
3*	67.5±6.4%	75	-	65	-	50	-	0	-	0	-	0	-	0	0	0	0	0	0	0
4*	70.0±4.0%	-	70	-	70	-	0	-	0	-	0	-	0	-	20	0	0	0	0	0
5*	70.0±4.0%	-	70	-	65	-	0	-	10	-	0	-	0	-	10	0	0	0	0	0
Número seminal	promedio antes	Evaluación a las 72 horas post-inoculación																		
		5	7	10	12	14	17	19	21	24	26	28	31	35	41	45	48	52	55	62
1*	62.5±2.8%	65	-	60	-	0	-	0	-	nd*	-	nd*	-	nd*						
2*	66.2±6.2%	60	-	65	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0	0	0	0	0	0
3*	61.2±2.5%	70	-	60	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0	0	0	0	0	0
4*	62.5±5.0%	-	60	-	50	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0	0	0	0	0
5*	62.5±2.8%	-	75	-	40	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0	0	0	0	0

Donde: La motilidad está expresada en porcentaje
nd* no se hizo dosis

* Se observó diferencia estadística significativa (P <0.05).

51

Cuadro No. 8.- Días de colecta de suero sanguíneo y títulos de anticuerpos IH (log 2) correspondientes a cada uno de los sementales.

No. de semental	Días post-inoculación.											
	antes	2	4	7	9	11	14	16	23	31	46	56
1	[-]	[-]	[-]	ne	[-]	ne	[-]	ne	[-]	ne	ne	4
2	[-]	[-]	[-]	ne	5	ne	6	ne	6	ne	ne	6
3	[-]	[-]	[-]	ne	5	ne	7	ne	ne	ne	ne	9
4	[-]	[-]	ne	[-]	ne	[-]	ne	[-]	ne	3	5	ne
5	[-]	[-]	ne	5	ne	7	ne	4	ne	5	5	ne

52

Donde: [-] = negativo
ne = no evaluado

Cuadro 9.- Resultados de la evaluación de la proporción global del efecto citopático y la hemoaglutinación ante un mismo fenómeno y grado de concordancia no aleatoria existente entre las dos técnicas de 63 muestras de semen en el primer pase del aislamiento del *rubulavirus porcino* (RVP) eliminado por esta vía.

		Hemoaglutinación		
		+	-	TOTAL
Efecto Citopático	+	14	15	29
	-	0	34	34
TOTAL		14	49	63

Sensibilidad de la prueba = 100 %
 Especificidad de la prueba = 69.39 %
 Índice de concordancia = 79.19 %
 Kappa = 0.5018

53

Cuadro 10.- Resultados del primer pase de los aislamientos del *rubulavirus porcino* (RVP) a partir de semen. Se señala con un signo +, los días que se recuperó el virus de cada uno de los cinco sementales durante el tiempo de observación.

número semental	Evaluaciones antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	-	ne	+	ne	+	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	-	-	-
2	[-]	-	ne	+	ne	+	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	+	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	+	-	-	-	-	-
4	[-]	ne	-	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	-	-	-
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	ne	+	-	-	-	-	-

Donde: ne = semental no evaluado
 - = negativo al aislamiento del RVP
 + = positivo al aislamiento del RVP

15

Cuadro 11.- Resultados de la evaluación de la proporción global del efecto citopático y la hemoaglutinación ante un mismo fenómeno y grado de concordancia no aleatoria existente entre las dos técnicas de 63 muestras de la fracción espermática en el primer pase del aislamiento del *rubulavirus porcino* (RVP) eliminado por esta vía.

		Hemoaglutinación		
		+	-	TOTAL
Efecto Citopático	+	10	19	29
	-	0	34	34
TOTAL		10	53	63

Sensibilidad de la prueba = 100 %
 Especificidad de la prueba = 64.15 %
 Índice de concordancia = 69.84 %
 Kappa = 0.3623

55

Cuadro 12.- Resultados del primer pase de los aislamientos del *rubulavirus porcino* (RVP) a partir de espermatozoides. Se señala con un signo +, los días que se recuperó el virus de cada uno de los cinco sementales durante el tiempo de observación.

número semental	Evaluaciones antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	-	ne	+	ne	-	-	-	-	-	-	-								
2	[-]	-	ne	-	ne	+	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	+	-	-
4	[-]	ne	-	ne	+	ne	-	-	+	-	-	-								
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	+	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	-	+	-	-	-

Donde: ne = semental no evaluado
 - = negativo al aislamiento del RVP
 + = positivo al aislamiento del RVP

56

Cuadro 13.- Resultados de la evaluación de la proporción global del efecto citopático y la hemoaglutinación ante un mismo fenómeno y grado de concordancia no aleatoria existente entre las dos técnicas de 63 muestras de la fracción plasmática en el primer pase del aislamiento del *rubulavirus porcino* (RVP) eliminado por esta vía.

		Hemoaglutinación		
		+	-	TOTAL
Efecto Citopático	+	15	16	31
	-	0	32	32
	TOTAL	15	48	63

Sensibilidad de la prueba = 100 %
 Especificidad de la prueba = 66.66 %
 Índice de concordancia = 74.60 %
 Kappa = 0.4878

57

Cuadro 14- Resultados del primer pase de los aislamientos del *rubulavirus porcino* (RVP) a partir de plasma. Se señala con un signo +, los días que se recuperó el virus de cada uno de los cinco sementales durante el tiempo de observación.

número semental	Evaluaciones antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	+	ne	+	ne	-	ne	+	ne	+	ne	-	ne	+	-	-	-	+	-	-
2	[-]	-	ne	-	ne	+	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	+	-	-	-
4	[-]	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	-	-
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	+	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	-	+	-	-	-

Donde: ne = semental no evaluado
 - = negativo al aislamiento del RVP
 + = positivo al aislamiento del RVP

58

Cuadro 15.- Resultados de la evaluación de la proporción global del efecto citopático y la hemoaglutinación ante un mismo fenómeno y grado de concordancia no aleatoria existente entre las dos técnicas de 63 muestras de semen en el segundo pase del aislamiento del *rubulavirus porcino* (RVP) eliminado por esta vía.

		Hemoaglutinación		
		+	-	TOTAL
Efecto Citopático	+	14	0	14
	-	0	49	49
TOTAL		14	49	63

Sensibilidad de la prueba = 100 %
Especificidad de la prueba = 100 %
Índice de concordancia = 100 %
Kappa = 1.0

Cuadro 16.- Resultados del segundo pase de los aislamientos del *rubulavirus porcino* (RVP) a partir de semen. Se señala con un signo +, los días que se recuperó el virus de cada uno de los cinco sementales durante el tiempo de observación.

número semental	Evaluaciones antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	-	ne	+	ne	+	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	-	-	-
2	[-]	-	ne	+	ne	+	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	+	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	+	-	-	-	-	-
4	[-]	ne	-	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	-	-	-
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	ne	+	-	-	-	-	-

Donde: ne = semental no evaluado
 - = negativo al aislamiento del RVP
 + = positivo al aislamiento del RVP

60

Cuadro 17.- Resultados de la evaluación de la proporción global del efecto citopático y la hemoaglutinación ante un mismo fenómeno y grado de concordancia no aleatoria existente entre las dos técnicas de 63 muestras de la fracción espermática en el segundo pase del aislamiento del *rubulavirus porcino* (RVP) eliminado por esta vía.

		Hemoaglutinación		
		+	-	TOTAL
Efecto Citopático	+	10	0	10
	-	0	53	53
TOTAL		10	53	63

Sensibilidad de la prueba = 100 %
 Especificidad de la prueba = 100 %
 Índice de concordancia = 100 %
 Kappa = 1.0

61

Cuadro 18.- Resultados del segundo pase de los aislamientos del *rubulavirus porcino* (RVP) a partir de espermatozoides. Se señala con un signo +, los días que se recuperó el virus de cada uno de los cinco sementales durante el tiempo de observación.

número semental	Evaluaciones antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	-	ne	+	ne	-	-	-	-	-	-	-								
2	[-]	-	ne	-	ne	+	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	+	-	-
4	[-]	ne	-	ne	+	ne	-	-	+	-	-	-								
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	+	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	-	+	-	-	-

Donde: ne = semental no evaluado
 - = negativo al aislamiento del RVP
 + = positivo al aislamiento del RVP

62

Cuadro 19.- Resultados de la evaluación de la proporción global del efecto citopático y la hemoaglutinación ante un mismo fenómeno y grado de concordancia no aleatoria existente entre las dos técnicas de 63 muestras de la fracción plasmática en el segundo pase del aislamiento del *rubulavirus porcino* (RVP) eliminado por esta vía.

		Hemoaglutinación		
		+	-	TOTAL
Efecto Citopático	+	17	0	17
	-	0	46	46
TOTAL		17	46	63

Sensibilidad de la prueba = 100 %
Especificidad de la prueba = 100 %
Índice de concordancia = 100 %
Kappa = 1.0

63

Cuadro 20.- Resultados del segundo pase de los aislamientos del *rubulavirus porcino* (RVP) a partir de plasma. Se señala con un signo +, los días que se recuperó el virus de cada uno de los cinco sementales durante el tiempo de observación.

número semental	Evaluaciones antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	+	ne	+	ne	-	ne	+	ne	+	ne	-	ne	+	-	-	-	+	-	-
2	[-]	-	ne	-	ne	+	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	+	-	-	-
4	[-]	ne	-	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	-	-
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	+	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	-	+	-	-	-

Donde: ne = semental no evaluado
 - = negativo al aislamiento del RVP
 + = positivo al aislamiento del RVP

64

Cuadro 21.- En la parte superior del cuadro, se muestran los títulos del virus de cada una de las muestras de semen que resultaron positivas en el primer pase durante el tiempo de observación de los sementales. En la parte inferior del cuadro, se muestran los títulos del RVP en el segundo pase.

número semental	Evaluaciones antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	-	ne	16	ne	2	ne	16	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	-	-	-
2	[-]	-	ne	64	ne	8	ne	32	ne	-	ne	-	ne	-	256	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	4	ne	-	ne	-	ne	-	64	-	-	-	-	-
4	[-]	ne	-	ne	2	ne	-	ne	64	ne	-	ne	64	ne	-	-	-	-	-	-
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	16	ne	-	ne	-	ne	-	ne	32	-	-	-	-	-

número semental	Evaluaciones antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	-	ne	32	ne	16	ne	32	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	-	-	-
2	[-]	-	ne	64	ne	16	ne	32	ne	-	ne	-	ne	-	256	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	16	ne	-	ne	-	ne	-	64	-	-	-	-	-
4	[-]	ne	-	ne	8	ne	-	ne	64	ne	-	ne	64	ne	-	-	-	-	-	-
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	32	ne	-	ne	-	ne	-	ne	32	-	-	-	-	-

Donde: ne = semental no evaluado
El título del virus está expresado en unidades hemoaglutinantes (UHA)

65

Cuadro 22.- En la parte superior del cuadro, se muestran los títulos del virus de cada una de las muestras de espermatozoides que resultaron positivas en el primer pase durante el tiempo de observación de los sementales. En la parte inferior del cuadro, se muestran los títulos del RVF en el segundo pase.

número semental	Evaluaciones antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	-	ne	64	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	-	-	-
2	[-]	-	ne	-	ne	4	ne	32	ne	-	ne	16	ne	-	-	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	64	-	-
4	[-]	ne	-	ne	64	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	-	32	-	-	-
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	128	ne	16	ne	-	ne	-	ne	-	-	64	-	-	-

número semental	Evaluaciones antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	-	ne	64	ne	-	-	-	-	-	-	-								
2	[-]	-	ne	-	ne	32	ne	64	ne	-	ne	32	ne	-	-	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	64	-	-
4	[-]	ne	-	ne	32	ne	-	-	32	-	-	-								
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	64	ne	32	ne	-	ne	-	ne	-	-	64	-	-	-

Donde: ne = semental no evaluado
 El título del virus está expresado en unidades hemoaglutinantes (UHA)

Cuadro No. 23.- En la parte superior del cuadro, se muestran los títulos del virus de cada una de las muestras de plasma que resultaron positivas en el primer pase durante el tiempo de observación de los sementales. En la parte inferior del cuadro, se muestran los títulos del RVP en el segundo pase.

número semental	Evaluaciones antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	32	ne	32	ne	-	ne	64	ne	64	ne	-	ne	64	-	-	-	32	-	-
2	[-]	-	ne	-	ne	4	ne	-	ne	-	ne	16	ne	-	-	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	16	ne	-	ne	8	ne	-	-	-	64	-	-	-
4	[-]	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	-	-
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	64	ne	32	ne	-	ne	32	ne	-	-	32	-	-	-

número semental	Evaluaciones antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	32	ne	64	ne	-	ne	64	ne	64	ne	-	ne	64	-	-	-	32	-	-
2	[-]	-	ne	-	ne	16	ne	-	ne	-	ne	64	ne	-	-	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	32	ne	-	ne	32	ne	-	-	-	64	-	-	-
4	[-]	ne	-	ne	8	ne	-	ne	32	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	-	-
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	64	ne	32	ne	-	ne	32	ne	-	-	32	-	-	-

Donde: ne = semental no evaluado

El título del virus está expresado en unidades hemoaglutinantes (UHA)

Cuadro 24.- Resultados de la evaluación de la proporción global de la hemoaglutinación y la inmunofluorescencia indirecta ante un mismo fenómeno y el grado de concordancia no aleatoria existente entre las dos técnicas.

		Inmunofluorescencia		
		+	-	TOTAL
Hemoaglutinación	+	14	0	14
	-	0	49	49
TOTAL		14	49	63

Sensibilidad de la prueba = 100 %
Especificidad de la prueba = 100 %
Índice de concordancia = 100 %
Kappa = 1.0

68

Cuadro 25.- Resultados de la evaluación de la proporción global de la hemoaglutinación y la inmunofluorescencia indirecta ante un mismo fenómeno y el grado de concordancia no aleatoria existente entre las dos técnicas.

		Inmunofluorescencia		
		+	-	TOTAL
Hemoaglutinación	+	10	0	10
	-	2	51	53
TOTAL		12	51	63

Sensibilidad de la prueba = 83.33 %

Especificidad de la prueba = 100 %

Índice de concordancia = 99.83 %

Kappa = 0.8901

69

Cuadro 26.- Resultados de la evaluación de la proporción global de la hemoaglutinación y la inmunofluorescencia indirecta ante un mismo fenómeno y el grado de concordancia no aleatoria existente entre las dos técnicas.

		Inmunofluorescencia		
		+	-	TOTAL
Hemoaglutinación	+	17	0	17
	-	0	46	46
TOTAL		17	46	63

Sensibilidad de la prueba = 100 %
Especificidad de la prueba = 100 %
Índice de concordancia = 100 %
Kappa = 1.0

70

Cuadro 27.- En la parte superior del cuadro, se pueden observar las muestras en donde se pudo identificar al RVP por la técnica de inmunofluorescencia indirecta a partir de semen. En la parte intermedia del cuadro, se pueden observar las muestras positivas al RVP a partir de espermatozoides. En la parte inferior del cuadro, se observan las muestras en donde se identificó el virus del ojo azul en las muestras de plasma.

número semental	Evaluación antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	-	ne	+	ne	+	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	-	-	-
2	[-]	-	ne	+	ne	+	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	+	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	+	-	-	-	-	-
4	[-]	ne	-	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	-	-	-
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	ne	+	-	-	-	-	-

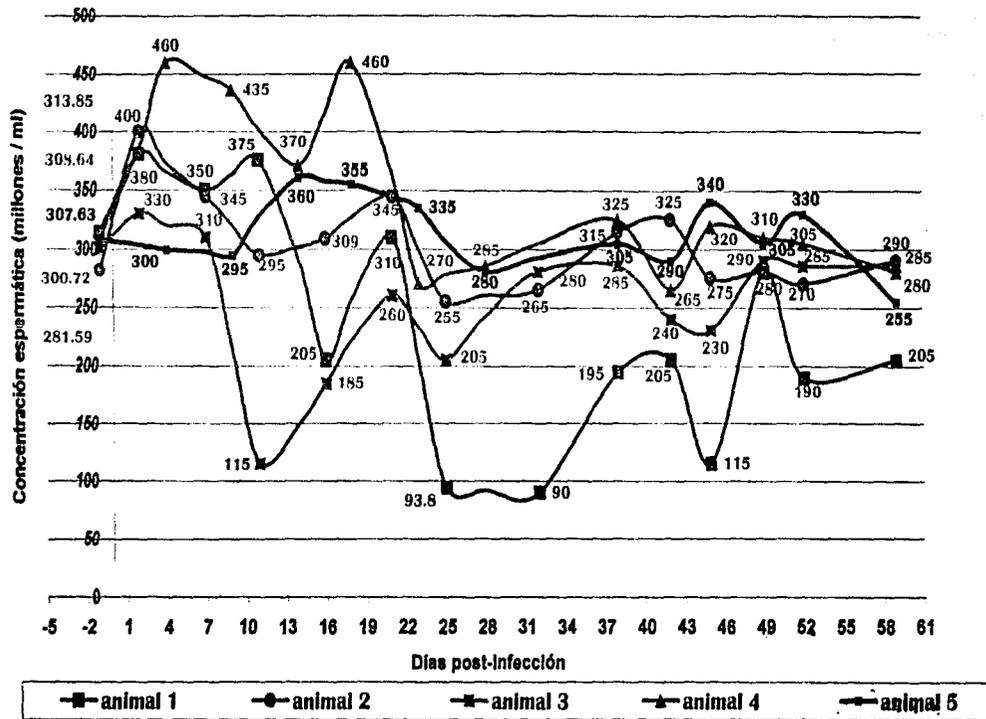
número semental	Evaluación antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	-	ne	+	ne	-	-	-	-	-	-	-								
2	[-]	-	ne	-	ne	+	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	-	+	-	-
4	[-]	ne	-	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	-	+	-	-	-
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	+	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	-	+	-	-	-

número semental	Evaluación antes	Días post-inoculación																		
		2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	38	42	45	49	52	59
1	[-]	+	ne	+	ne	-	ne	+	ne	+	ne	-	ne	+	-	-	-	+	-	-
2	[-]	-	ne	-	ne	+	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	-	-	-	-
3	[-]	-	ne	-	ne	-	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	-	-	+	-	-	-
4	[-]	ne	-	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	ne	-	ne	-	-	-	-	-	-
5	[-]	ne	-	ne	-	ne	+	ne	+	ne	-	ne	+	ne	-	-	+	-	-	-

71

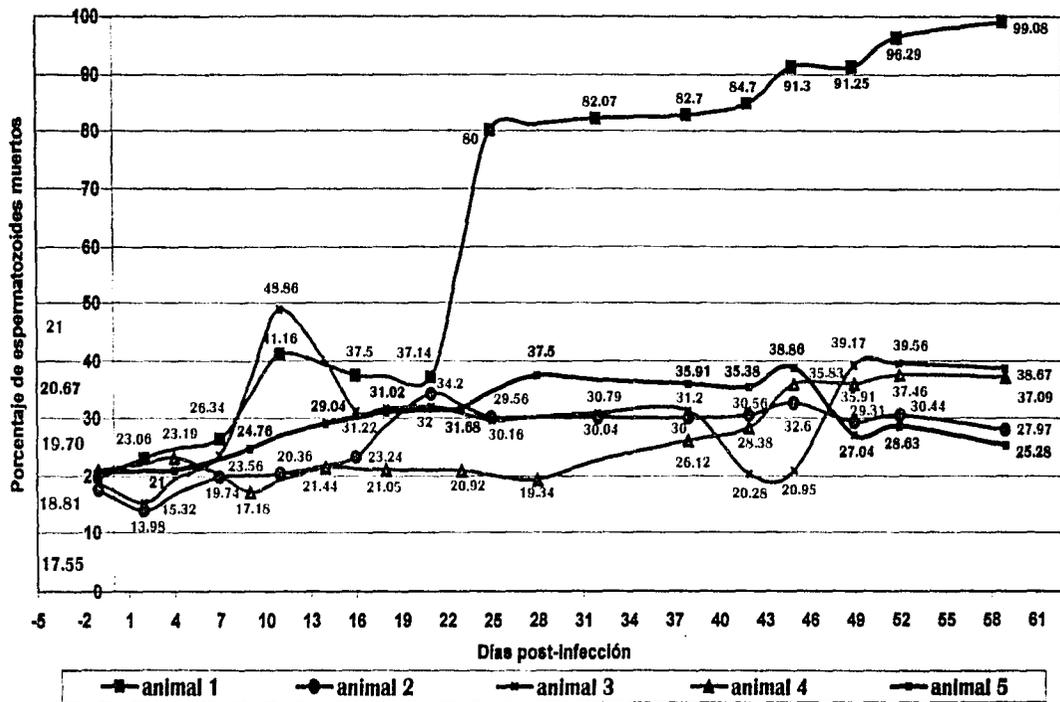
Gráficas

Gráfica 1. Promedio de la concentración espermática de cada uno de los sementales antes de la inoculación con el RVP y valores observados durante el tiempo de experimentación (59 días).

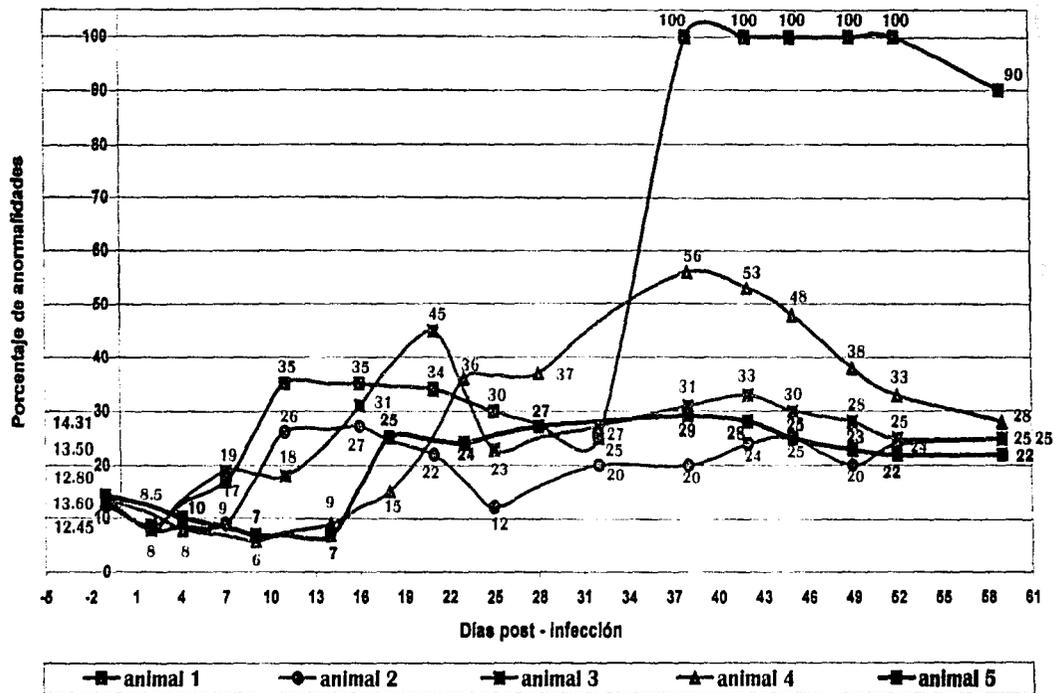


73

Gráfica 2. Promedio de los espermatozoides muertos (IP positivos) de cada uno de los sementales antes de la inoculación con el RVP y valores observados durante el tiempo de observación.



Gráfica 3. Promedio de las anomalías espermáticas de cada uno de los sementales antes de la inoculación con el RVP y valores observados durante el tiempo de experimentación.



75

Fotografías

Fotografía 1.- Efecto citopático que el rubulavirus porcino le ocasiona a los cultivos celulares. En la fotografía se observan varios grupos de células VERO fusionadas. A su alrededor se observa destrucción celular. El cultivo celular fue teñido con cristal violeta y observado en un microscopio óptico. Aumento 200 X.

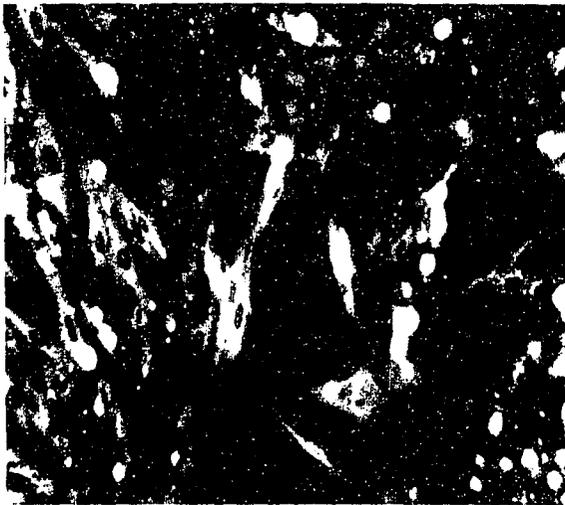


77

Fotografía 2.- Efecto citopático que el rubulavirus porcino le ocasiona a los cultivos de células VERO. En la fotografía se muestra la destrucción celular que el virus le ocasiona a las células. Cultivo de células VERO teñido con cristal violeta y observado en un microscopio óptico. (200 X).

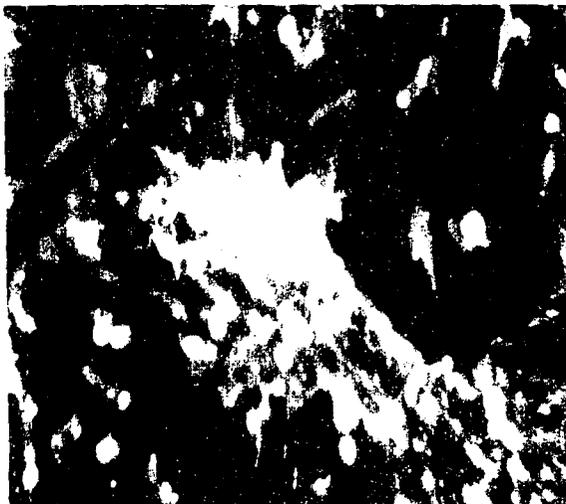


Fotografía 3.- Identificación del rubulavirus porcino (RVP) en cultivos de células VERO por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). En la fotografía se muestran células que presentan fluorescencia muy brillante dentro su citoplasma. Las áreas en color negro indican espacios libres, asociados a la lisis que el RVP le ocasiona a los cultivos celulares. Aumento 200 X.



ESTAS TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

Fotografía 4.- Identificación del rubulavirus porcino (RVP) en cultivos de células VERO por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). En la fotografía se muestra un grupo de células fusionadas con fluorescencia muy brillante. Las áreas en color negro indican espacios libres, asociados a la lisis que el RVP le ocasiona a los cultivos celulares. Aumento 200 X.



80

Fotografía 5.- Identificación del rubulavirus porcino (RVP) en cultivos de células VERO por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). En la fotografía se muestra un sincitio con fluorescencia muy intensa. Las áreas en color negro son espacios sin células, asociados a la lisis que el virus le ocasiona a los monoestratos celulares. Aumento 200X.

